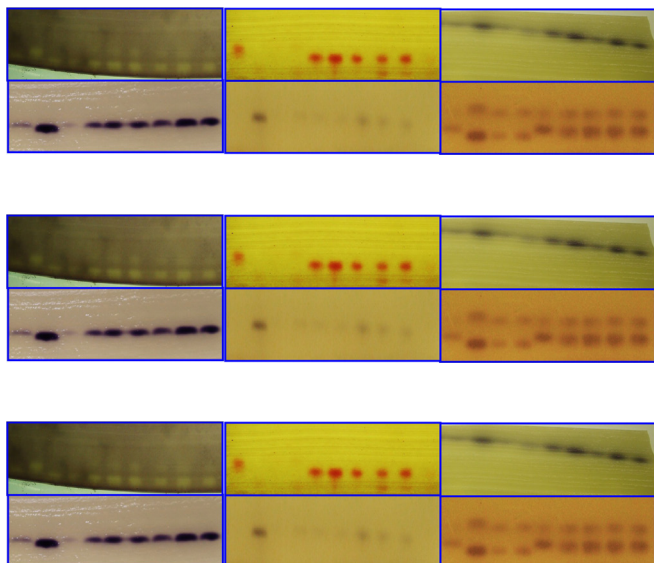


Foto: Cristiane Vieira Helm



Caracterização genética de isolados de macrofungos do gênero *Agaricus*, através de marcadores isoenzimáticos

Cristiane Vieira Helm¹
Daiane Rigoni Kestring²
Juliana Hey Coradin³

As isoenzimas constituem uma fonte de marcadores genéticos. A variabilidade genética dos padrões isoenzimáticos de uma população é geralmente atribuída à segregação genética e denominada de polimorfismo (HEDRICK, 1983). Esta variabilidade pode ser acessada através de técnicas como a eletroforese, que consiste na migração de moléculas ionizadas, conforme suas cargas elétricas e massas moleculares em campo elétrico.

Para a análise eletroforética de proteínas e isoenzimas podem ser empregados tecidos vegetativos ou reprodutivos de fungos, como micélio, conídios, uredosporos, teliosporos, esclerócios, estroma, ascocarpo ou basidiocarpo. O material ou tecido utilizado deve ser o mesmo para todas as culturas a serem comparadas, e as condições de cultivo, tais como meio de cultura, temperatura e fotoperíodo devem ser padronizadas. Estas condições minimizam variações de expressão diferencial de enzimas indutivas e de genes, de acordo com a diferenciação de tecidos.

Deve-se determinar a curva de crescimento do microrganismo em meio de cultura definido, para utilizar o micélio das culturas na fase exponencial de crescimento. Isso minimiza a ação das enzimas proteolíticas e a expressão de genes em função da diferenciação dos tecidos (ALFENAS, 1998).

O objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização genética de isolados de macrofungos do gênero *Agaricus*, através de marcadores bioquímicos (isoenzimas).

Para a obtenção da massa micelial, foram avaliados dez isolados de macrofungos do gênero *Agaricus* da coleção de culturas da Embrapa Florestas (Tabela 1).

Os fungos foram cultivados, inicialmente, em placas de Petri, em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) a 25 °C por 20 dias. Posteriormente, foram inoculados em meio líquido (10 g L⁻¹ sacarose; 2 g L⁻¹ L-asparagina; 2 g L⁻¹ extrato de levedura; 1 g

¹Química industrial, Doutora, Pesquisadora da Embrapa Florestas, cristiane@cnpf.embrapa.br

²Farmacêutica e bioquímica, Analista da Embrapa Florestas, drigone@cnpf.embrapa.br

³Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, Mestre, Analista da Embrapa Clima Temperado, juliana.coradin@cpact.embrapa.br

L^{-1} KH_2PO_4 ; 0,1 g L^{-1} $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,44 mg L^{-1} $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,48 mg L^{-1} $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 0,36 mg L^{-1} $MnCl_2 \cdot H_2O$; pH 5,3). A inoculação foi feita em frascos, visando à obtenção de massa micelial em quantidade suficiente para a visualização de bandas nos géis de eletroforese. Foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 125 mL, em duplicata, contendo 60 mL de meio de cultura. Os fungos foram cultivados em e incubados em agitador rotatório, sem controle de rotação, a 25 °C por 15 dias.

A metodologia foi estabelecida e adaptada pelo método proposto por Alfenas (1998). Foram testados os seguintes sistemas enzimáticos:

- Fosfoglucomutase – PGM (EC 5.4.2.2);
- Glutamato oxaloacetato transaminase – GOT (2.6.1.1);
- Malato desidrogenase – MDH (1.1.1.37);
- Xiquimato desidrogenase – SKDH (1.1.1.25);
- 6-Fosfogluconato desidrogenase – 6-PGDH;
- Superóxido dismutase – SOD (EC 1.15.1.1); e
- Peroxidase – PO (EC 1.11.1.7).

As isoenzimas foram detectadas através de eletroforese em gel de amido, conforme descrito por Alfenas (1998). Três tipos de géis foram empregados:

- Gel de lítio-borato (LB), para a detecção das enzimas glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) e fosfoglucomutase (PGM);

- Gel de tris-citrato (TC), para a detecção das enzimas 6-fosfogluconato desidrogenase (6-PGDH), malato desidrogenase (MDH) e xiquimato desidrogenase (SKDH);
- Gel de oxidases, para a detecção das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (PO).

Para o preparo dos géis, 36 g de penetrose foram misturadas com 4,05 g de sacarose em 300 mL da solução tampão do respectivo gel, como segue:

- Tampão do gel LB: 6,2 g de tris; 2 g de ácido cítrico; 1 L de água destilada; pH 8,4.
- Tampão do eletrodo TC: 72 g de tris; 40 g de ácido cítrico; 4 L de água destilada; pH 7,4.
- Tampão do eletrodo LB: 47,2 g de ácido bórico; 4 g de hidróxido de lítio; 1 L de água destilada; pH 8,1.
- Tampão do eletrodo oxidases: 60,6 g de tris; 6 g de EDTA Na_2H_2O ; 40 g de ácido bórico; 1 L de água destilada; pH 8,0.

No caso do gel LB, os 300 mL de tampão consistiram de 15 mL de tampão do eletrodo e 285 mL do tampão do gel. Para o gel TC, foram adicionadas à penetrose e à sacarose 90 mL do tampão do eletrodo TC e 210 mL de água destilada.

Tabela 1. Isolados de macrofungos do gênero *Agaricus* da coleção de culturas da Embrapa Florestas.

Espécie	Isolado	Procedência / Data da coleta
<i>Agaricus cf. fuscofibrillosus / mediofuscus</i>	CNPF 41	Embrapa Florestas, Colombo, PR, 08.11.1999
<i>Agaricus cf. campester var. fuscopilosellus</i>	CNPF 63	Reserva Biológica Cambuí, Curitiba, PR, 15.05.2000
<i>Agaricus brasiliensis</i>	CNPF 72	Embrapa Florestas, Colombo, PR, 22.01.2001
<i>Agaricus brasiliensis</i>	CNPF 89	Isolado comercial gentilmente cedido pelo Tecpar, Curitiba, PR, 20.03.2001
<i>Agaricus</i> sp.	CNPF 134	Embrapa Florestas, Colombo, PR, 08.11.2004
<i>Agaricus</i> sp.	CNPF 135	Embrapa Florestas, Colombo, PR, 09.06.2005
<i>Agaricus</i> sp.	CNPF 136	Embrapa Florestas, Colombo, PR, 16.06.2005
<i>Agaricus</i> sp.	CNPF 137	Embrapa Florestas, Colombo, PR, 12.07.2005
<i>Agaricus</i> sp.	CNPF 138	Embrapa Florestas, Colombo, PR, 20.07.2005
<i>Agaricus</i> sp.	CNPF 139	Embrapa Florestas, Colombo, PR, 21.07.2005

Para o gel das oxidases, o tampão utilizado foi o mesmo do seu eletrodo, diluído em 1:10. A solução foi então aquecida em microondas por 10 minutos, agitando-a fortemente a cada minuto nos primeiros 5 minutos e, depois, a cada trinta segundos. O procedimento foi repetido até a fervura. As bolhas foram eliminadas com o auxílio de uma bomba de vácuo.

A solução do gel foi vertida entre as molduras de acrílico, tomando-se cuidado para a eliminação das bolhas, sendo deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente. O gel foi, então, armazenado em geladeira a 4 °C, para ser utilizado no dia seguinte.

A extração das enzimas foi feita a partir da massa micelial dos fungos cultivados nas condições descritas anteriormente. Inicialmente, foram utilizadas culturas em BDA em placas de Petri. O micélio obtido por raspagem da superfície das placas foi submetido à extração. Posteriormente, o procedimento de cultivo em meio líquido foi adotado para a padronização da quantidade de micélio empregada na extração das enzimas e melhor visualização das bandas. Nesse caso, o micélio foi obtido por filtração.

A extração consistiu em pesar cerca de 200 mg do micélio de cada fungo e fazer a extração em um poço da placa de maceração adicionando de duas a três gotas do tampão de extração. O micélio foi submetido à maceração mecânica com bastões de vidro. O procedimento foi realizado sobre banho de gelo, em ambiente com temperatura controlada (25 °C) para evitar a desnaturação das enzimas.

Para a realização da corrida, *wicks* (papel filtro cortado em 4 mm x 10 mm) foram imersos em cada poço, a fim de absorver o conteúdo líquido da maceração.

Composição do tampão de extração:

- 600 mg de PVP
- 1g de sacarose
- 10 mg de EDTA

- 20 mg de albumina bovina
- 20 mL de solução base*

*A solução base é composta de 800 mg de tris em 100 mL de água, pH 7,5

Condições de corrida da eletroforese

Após o corte e posicionamento dos *wicks* no gel, estes foram conectados às cubas dos eletrodos.

As condições de corrida utilizadas foram:

- Gel LB: 320 V e 80 mA
- Gel TC: 180 V e amperagem variável
- Gel oxidases: 70 V e 15 mA

Os *wicks* embebidos em azul de bromofenol foram utilizados como marcadores de corrida. Uma pré-corrida foi feita durante 20 minutos, a fim de que as proteínas fossem liberadas das tiras de papel contendo o extrato para o gel. Após esse período, as tiras de papel foram removidas.

As corridas foram feitas por aproximadamente 4 horas a 4 °C.

Revelação dos géis

Após a corrida, o gel foi cortado horizontalmente em fatias de aproximadamente 1 mm. Cada fatia foi imersa em uma solução de revelação específica, de acordo com a enzima a ser revelada, como segue:

- Fosfoglucomutase (PGM, EC 5.4.2.2): 150 mg D-glucose-1-fosfato; 50 mL Tris HCl pH 8,0; 5 mL NADP (solução); 1,5 mL MgCl₂; 2,5 mL MTT (solução); 1,5 mL PMS (solução); duas gotas glucose-6-fosfato.
- Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT, EC 2.6.1.1): 150 mg ácido L-aspartico; 80 mg ácido cetoglutarico; 100 mg *fast-blue* BB; 50 mL água.
- Malato desidrogenase (MDH, EC 1.1.1.37): 80 mg ácido málico; 50 mL tris HCl pH 9,0; 5 mL NAD (solução); 2 mL MgCl₂; 2,5 mL MTT (solução); 1,5 mL PMS (solução).

- Xiquimato desidrogenase (SKDH, EC 1.1.1.25): 60 mg ácido xiquímico; 50 mL tris HCl, pH 9,0; 5 mL NADP (solução); 1 mL $MgCl_2$; 2 mL MTT (solução); 1,5 mL PMS (solução).
- 6-Fosfogluconato desidrogenase (6-PGDH, EC 1.1.1.44): 40 mg ácido fosfogluconico; 50 mL tris HCl, pH 8,0; 5 mL NADP (solução); 1 mL $MgCl_2$; 2,5 mL MTT (solução); 1,5 mL PMS (solução).
- Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1): **Solução A:** 100 mL tampão fosfato 50 mM, pH 7,5; 20 mg MTT. **Solução B:** 100 mL tampão fosfato 50 mM, pH 7,5; 0,4 mL de TEMED; 1 mg riboflavina.
- Peroxidase (PO, EC 1.11.1.7): **Solução A:** 50 mL tampão acetato 0,1M, pH 4,5; 50 mL metanol; 50 mg TBZ. **Solução B:** 2 mL H_2O_2 , 3%.

Fatias do gel LB foram reveladas pelos sistemas GOT e PGM, e do gel TC pelo MDH, SKDH e 6-PGDH. A fatia imersa na solução de revelação foi incubada a 30 °C, no escuro, pelo tempo necessário para a revelação das bandas.

Para as oxidases, o procedimento de revelação foi diferente. No sistema da peroxidase (PO), a fatia foi incubada no escuro, com a solução A, por 30 min. Em seguida, foi adicionada solução de revelação B e homogenizado. As bandas puderam ser vistas dentro de alguns minutos. Já no caso do sistema da superóxido dismutase (SOD), a fatia de gel para revelação foi incubada no escuro imersa em solução A, a 30 °C, por 20 min. Após esse tempo, a solução foi descartada e o gel foi incubado na solução B, sob iluminação, por 15 min, até o aparecimento das bandas.

Similaridade genética

Com base nos padrões de bandas das isoenzimas foi construída uma matriz de dados binários. A partir da matriz de similaridade genética, contruiu-se um dendrograma pelo método UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*). Este método agrupa as amostras (no caso, os isolados) levando em conta as médias não ponderadas de similaridade. Para tal, usou-se o programa computacional NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis*) (ROHLF, 1988).

A análise de similaridade genética tem sido usada na classificação e caracterização genética de plantas e fungos. Diferenças nos padrões de isoenzimas já foram usadas para separar espécies do gênero *Agaricus* (KERRIGAN; ROSS, 1988) e linhagens da espécie *Agaricus bisporus* (ROYSE; MAY, 1989).

A extração de isoenzimas a partir da raspagem do micélio desenvolvido em placa de Petri (Figura 1) não produziu uma boa resolução das bandas nos géis de eletroforese, razão pela qual os dados foram desprezados.

Foto: Cristiane Vieira Helm

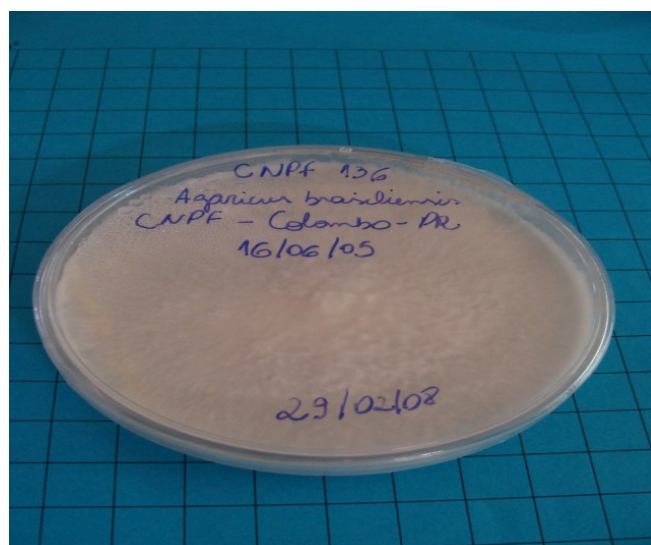


Figura 1. Cultivo em meio sólido.

Os resultados aqui apresentados referem-se aos obtidos pela extração das enzimas das massas miceliais produzidas por cultivo em meio líquido (Figura 2).

Foto: Cristiane Vieira Helm

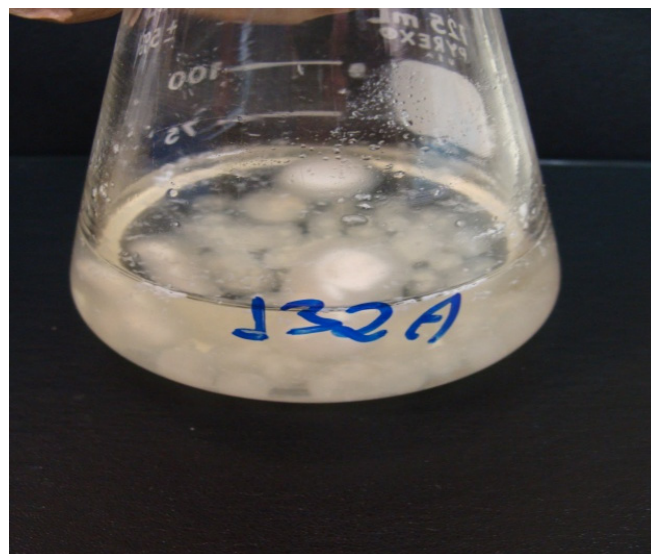


Figura 2. Cultivo em meio líquido.

Com base na matriz de dados gerada neste estudo, construiu-se o dendrograma apresentado na Figura 3. Observa-se a separação de dois grupos, sendo o primeiro constituído pelos isolados 5 a 10 e o outro pelos isolados 1 a 4. Foi encontrada uma alta similaridade entre os isolados que compõem o primeiro agrupamento, indicando que pertencem a mesma espécie. O mesmo aconteceu com o subgrupo formado pelos isolados 3 e 4, ambos da espécie *Agaricus brasiliensis*. Os sistemas isoenzimáticos empregados foram úteis para a discriminação de espécies dentro do gênero *Agaricus* (Figura 3). No entanto, isto deve ser considerado com cautela, pois um número muito limitado de isolados foi utilizado no estudo.

Além de auxiliar na identificação de espécies, entre as aplicações da análise isoenzimática de maior interesse para o estudo dos macrofungos, a avaliação da variabilidade genética entre linhagens de coleções de germoplasma é de grande importância para determinar quais delas são realmente diferentes e, portanto,

úteis para programas de seleção e melhoramento. A discriminação de linhagens – *fingerprinting* ou caracterização genética de determinado genótipo – é também fundamental para a certificação e processos de patenteamento. As diferentes linhagens devem apresentar distintos padrões de bandas, com reprodutibilidade e estabilidade, ou seja, o mesmo padrão deve ser obtido se o procedimento for repetido, independentemente das condições ambientais em que forem cultivadas. Aloenzimas, sequências de DNA, e locos de números variáveis de repetições tandem (VNTR) são todos candidatos válidos para esse papel (ROYSE ; MAY, 1993).

Numa triagem de 37 enzimas em extratos miceliais de *Agaricus bisporus*, Royse e May (1989) encontraram atividade limitada ou nula para 20 das enzimas e baixa resolução para outras três (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexoseaminidase e isocitrato desidrogenase). Onze delas (alfa-glucosidase, catalase, glucuronidase, guanina desaminase, lactato

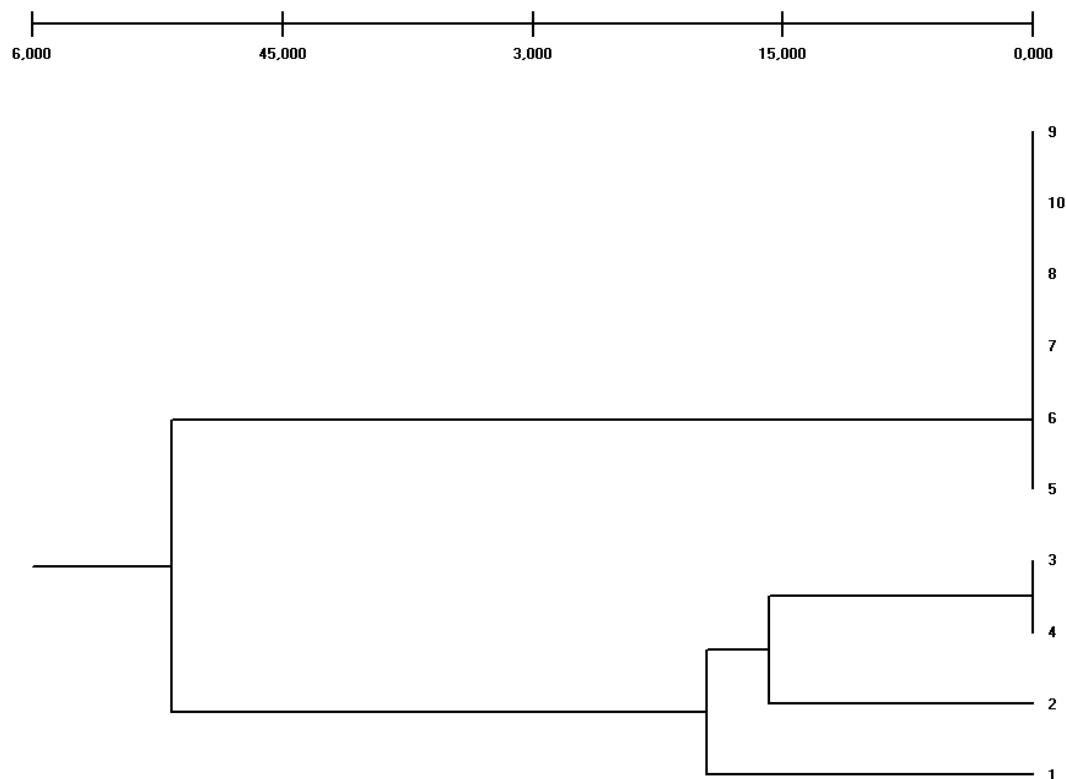


Figura 3. Dendrograma de similaridade genética com base nas bandas de isoenzimas de 2 grupos de 10 isolados de macrofungos da coleção de culturas da Embrapa Florestas.

desidrogenase, malato desidrogenase, enzima málica, peptidase com fenilalanil-prolina, fosfogluconato desidrogenase, piruvato quinase e xiquimato quinase mostraram-se monomórficas. As últimas três (fosfatase ácida, butilesterase e fosfoglucomutase) mostraram-se polimórficas, tendo, assim, sido identificadas como novos marcadores bioquímicos para *Agaricus bisporus*. Num estudo prévio, cinco outros marcadores já haviam sido identificados pelos mesmos autores (ROYSE; MAY, 1982). Assim, nove marcadores bioquímicos – correspondendo aos locos dos genes estruturais Aat (AAT - aspartato aminotransferase, EC 2.6.1.1); Acp (ACP – fosfatase ácida, EC 3.1.3.2); Adh (ADH – álcool desidrogenase, EC 1.1.1.1); EstB-1 (ESTB – butilesterase, EC 3.1.1.1.); Gpt (GPT - transaminase glutamicopirúvica, EC 2.6.1.2); Pep-1 e Pep-2 (PEP-LLL – peptidase com leucil-leucil-leucina, EC 3.4.13.11); e Pgm (PGM - fosfoglucomutase, EC 2.7.5.1) – estão disponíveis para a caracterização da diversidade genética de isolados de *Agaricus bisporus*. Um estudo semelhante se faz necessário para a obtenção de marcadores para a espécie *Agaricus brasiliensis*.

Conclusão

Os sistemas testados permitiram dividir os isolados em grupos, de acordo com as espécies, separando os isolados de *A. brasiliensis* daqueles de *A. fuscofibrillosus* e *A. campester*. Seis outros isolados, ainda não identificados em nível de espécie, foram agrupados como pertencentes a uma mesma espécie (100% de identidade), diferente das demais. Sendo assim, o método mostrou-se útil para analisar a variabilidade interespecífica dentro do gênero estudado. Entretanto, os sistemas utilizados não foram suficientemente polimórficos para

distinguir linhagens de uma mesma espécie. Outros sistemas deverão ser testados para essa finalidade.

Referências

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, MG: UFV, 1998.
- HEDRICK, P. W. Identification of a locus modifying the electrophoretic mobility of malate dehydrogenase isoenzymes in incense cedar (*Calocedrus decurrens*) and its implication for population studies. **Biochemical Genetics**, New York, v. 2, n. 5-6, p. 417-34, 1983.
- ROHLF, F. J. **NTSYS**: numerical taxonomy system, applied biostatistics. Setauket, NY: Applied Biostatistics, 1988.
- ROYSE, D. N.; MAY, B. Genetic relatedness and its application in selective breeding of *Agaricus brunnescens*. *Mycologia*, New York, v. 74, n. 4, p. 569-575, 1982.
- ROYSE, D. N.; MAY, B. Identification and use of three new biochemical markers in *Agaricus bisporus*. **Agricultural and biological chemistry**, Tokyo, v. 53, n. 11, p. 2861-2866, 1989.
- ROYSE, D. N.; MAY, B. Multilocus enzyme electrophoresis for the genetic analysis of edible mushrooms. In: CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A.; MILES, P. G. **Genetics and breeding of edible mushrooms**. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers, 1993. p. 225-247.

Comunicado Técnico, 292

Embrapa Florestas

Endereço: Estrada da Ribeira Km 111, CP 319

Colombo, PR, CEP 83411-000

Fone / Fax: (0**) 41 3675-5600

E-mail: sac@cnpf.embrapa.br



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



1ª edição

Versão eletrônica (2012)

Comitê de Publicações

Presidente: Patrícia Póvoa de Mattos

Secretária-Executiva: Elisabete Marques Oaida

Membros: Álvaro Figueredo dos Santos,
Antonio Aparecido Carpanezzi, Claudia Maria Branco de
Freitas Maia, Dalva Luiz de Queiroz, Guilherme Schnell
e Schuhli, Luís Cláudio Maranhão Froufe,
Marilice Cordeiro Garrastazu, Sérgio Gaiad

Expediente

Supervisão editorial: Patrícia Póvoa de Mattos

Revisão de texto: Patrícia Póvoa de Mattos

Normalização bibliográfica: Francisca Rasche

Editoração eletrônica: Rafaela Crisostomo Pereira